

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

2004/000416

#2

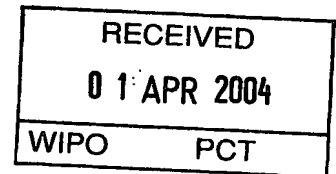
16.02.04

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 1月20日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-011099  
[ST. 10/C]: [JP 2003-011099]



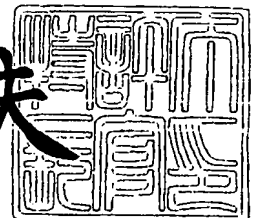
出 願 人  
Applicant(s): 鐘淵化学工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 3月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3021752

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4974

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 7/62  
C12S 3/02

【発明者】

【住所又は居所】 明石市大久保町ゆりのき通2-3-5 サウススクエア  
1-701号

【氏名】 柳田 義文

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17 三青荘

【氏名】 小川 典子

【発明者】

【住所又は居所】 姫路市網干区和久140-15

【氏名】 上田 恭義

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市大安寺東町17-7

【氏名】 小坂田 史雄

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市大森町11-33

【氏名】 松本 圭司

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物菌体からの高純度ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の回収方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物細胞からポリヒドロキシアルカノエートを回収する方法であって、次の(a)と(b)の工程からなる。

(a) ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物細胞の水性懸濁液に、攪拌と物理的破碎処理を行いながらアルカリを添加し、該細胞を破碎すると共に、該細胞中のポリヒドロキシアルカノエート以外の細胞物質を可溶化あるいは乳化させ、次いでポリヒドロキシアルカノエートを懸濁液から分離する工程；

(b) 分離されたポリヒドロキシアルカノエートを、酵素及び／又は界面活性剤で処理し、ポリヒドロキシアルカノエートに付着した不純物を可溶化又は分解後可溶化し、続いて親水性溶媒でポリヒドロキシアルカノエートを洗浄する工程。

【請求項2】 ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物細胞からポリヒドロキシアルカノエートを回収する方法であって、次の(a)から(c)の工程からなる。

(a) ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物細胞の水性懸濁液に、攪拌と物理的破碎処理を行いながらアルカリを添加し、該細胞を破碎すると共に、該細胞中のポリヒドロキシアルカノエート以外の細胞物質を可溶化あるいは乳化させ、次いでポリヒドロキシアルカノエートを懸濁液から分離する工程；

(b) 分離されたポリヒドロキシアルカノエートを、酵素及び／又は界面活性剤で処理し、ポリヒドロキシアルカノエートに付着した不純物を可溶化又は分解後可溶化し、続いて親水性溶媒でポリヒドロキシアルカノエートを洗浄する工程；

(c) 洗浄されたポリヒドロキシアルカノエートを、親水性溶媒に懸濁し、該懸濁液の沸点以下の温度で攪拌することによりポリヒドロキシアルカノエートを凝集させて粒度を大きくし、次いで凝集したポリヒドロキシアルカノエートを懸濁

液から分離する工程。

【請求項 3】 ポリヒドロキシアлкаノエートが、3-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシプロピオネート、4-ヒドロキシブチレート、4-ヒドロキシバレレート、5-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシペンテノエート、3-ヒドロキシヘキサノエート、3-ヒドロキシヘプタノエート、3-ヒドロキシオクタノエート、3-ヒドロキシノナエートおよび 3-ヒドロキシドカネートからなる群から選択されるモノマーのうち少なくとも 2 種類以上が共重合した共重合体であることを特徴とする請求項 1 あるいは 2 に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの回収方法。

【請求項 4】 ポリヒドロキシアлкаノエートが、3-ヒドロキシヘキサノエートと他のヒドロキシアлкаノエート 1 種以上との共重合体であることを特徴とする請求項 3 に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの回収方法。

【請求項 5】 ポリヒドロキシアлкаノエートが、3-ヒドロキシヘキサノエートと 3-ヒドロキシブチレートとの共重合体であることを特徴とする請求項 4 に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの回収方法。

【請求項 6】 工程 (a) において、物理的破碎処理を高圧ホモジナイザーで行うことを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの回収方法。

【請求項 7】 工程 (a) において、pH をコントロールしながら、連続的又は断続的にアルカリを添加することを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの回収方法。

【請求項 8】 工程 (a) において、pH を 9～13.5 の間にコントロールすることを特徴とする請求項 7 に記載のポリヒドロキシアлкаノエート回収の方法。

【請求項 9】 工程 (a) において使用するアルカリが、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムおよび水酸化リチウムからなる群より選択される 1 種以上であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの回収方法。

【請求項 10】 工程 (b) において使用するアルカリが、水酸化ナトリウ

ム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムおよび水酸化リチウムからなる群より選択される1種以上であることを特徴とする請求項1～9のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項11】 工程(b)において使用する酵素が、蛋白質分解酵素、脂肪酸類分解酵素、細胞壁分解酵素およびDNA分解酵素からなる群より選択される1種以上であることを特徴とする請求項1～10のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項12】 工程(b)において、洗浄に用いる親水性溶媒が、アセトニトリル、アセトン、エタノール、テトラヒドロフランおよびメタノールからなる群より選択される1種以上であることを特徴とする請求項1～11のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項13】 工程(c)において使用する親水性溶媒が、アセトニトリル、アセトン、エタノール、テトラヒドロフランおよびメタノールからなる群より選択される1種以上であることを特徴とする請求項1～12のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項14】 ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物が、*Alcaligenes*属、*Azotobacter*属、*Bacillus*属、*Clostridium*属、*Halobacterium*属、*Norcadia*属、*Photospillium*属、*Pseudomonas*属、*Ralstonia*属および*Zoogloea*属からなる群より選択される微生物であることを特徴とする請求項1～13のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項15】 ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物が、アエロモナス・キャビエである請求項14記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項16】 ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のポリヒドロキシアルカノエート合成遺伝子群を導入された形質転換体である請求項1～15のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【請求項 17】 ポリヒドロキシアルカノエート含有微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のポリヒドロキシアルカノエート合成遺伝子群を導入された *Ralstonia eutropha* である請求項 16 に記載のポリヒドロキシアルカノエートの回収方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生分解性を有するポリエステル系樹脂の微生物細胞からの分離・回収方法及び該樹脂粒子の凝集方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ポリヒドロキシアルカノエート（以後 PHA と略す）は、多くの微生物種の細胞内にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される熱可塑性ポリエステルである。微生物によって天然の有機酸や油脂を炭素源に生産される PHA は、土中や水中の微生物により完全に生分解され、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることになるため、生態系への悪影響がほとんどない環境調和型のプラスチック材料と言える。近年、合成プラスチックが環境汚染、廃棄物処理、石油資源の観点から深刻な社会問題となるに至り、PHA が環境に優しいグリーンプラスチックとして注目され、その実用化が切望されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体などの生体適合性プラスチックとして利用が可能と考えられており、実用化が期待されている。

【0003】

微生物が生産する PHA は、通常顆粒体として微生物細胞内に蓄積されるため、PHA をプラスチックとして利用するためには、微生物細胞内から PHA を分離して取り出すという工程が必要である。PHA を微生物細胞から分離精製する既知の方法として、大別すると、PHA が可溶である有機溶媒を用いて微生物細胞から PHA を抽出する方法と、PHA 以外の細胞構成成分を破碎もしくは可溶化させて除くことにより PHA を得る方法に分けられる。

【0004】

初期の研究では有機溶媒による抽出を利用したPHAの分離精製方法が多く報告されている（特許文献1～5参照）。これらの報告ではPHAの溶解度が最も高い有機溶媒としてクロロホルムなどのハロゲン化合物が用いられているが、PHAを該溶剤に溶解すると溶液の粘性が非常に高くなり取り扱いが困難であった。そのためPHAの抽出にはポリマー濃度を2～3%程度と極めて薄い条件で処理する必要があり、従って非常に大量の溶媒を必要とした。加えて、溶媒層からPHAを高い回収率で晶析させるためには、上記溶媒の4～5倍容という大量のメタノールやヘキサン等のPHA貧溶媒が別途必要である。そのため、工業的に生産するには大規模な設備が必要となる。さらには、溶媒の使用量が膨大なため溶媒の回収コストと損失溶媒のコストがかさみ、PHAを安価に製造できないなどの理由から、この方法は実用化されていない。

#### 【0005】

一方、PHA以外の細胞構成成分を化学的処理あるいは物理的破碎処理によって可溶化させて除き、PHAを顆粒体のまま回収する方法が種々報告されている。

#### 【0006】

微生物細胞（以下、菌体ということもある）を化学的処理する方法としては、非特許文献1に菌体懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムで処理してPHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法では、PHA以外の菌体構成成分の可溶化がなされるけれど、それと同時にPHAの著しい分解が引き起こされるため、製品への加工が制限されてしまう。さらに、PHA内に無視できない塩素臭が残るため、ポリマー製品として好ましくないことから実用には適さないと考えられる。特許文献6には、熱処理と酵素、界面活性剤を併用した回収法が示されている。この方法では、酵素処理により菌体を溶解した場合、遊離する核酸により懸濁液が非常に粘稠になるため、予め懸濁液を100℃以上で加熱し核酸を分解する必要がある。ところが、100℃以上での加熱によりPHAは著しく低分子化してしまい、製品への応用ができなくなる。また、この方法は非常に複雑で多くの工程を必要とするにもかかわらず、得られるPHAの純度は概ね88%、最大でも97%程度である。また、PHA含有微生物



物菌体を界面活性化剤で処理したのち、菌体から放出された核酸を過酸化水素で 80℃、3 時間処理して分解し、99%純度の PHA を分離する方法（特許文献 7 参照）や、PHA 含有微生物懸濁液を pH 2 未満の強酸性下 50℃以上に熱した後 PHA を分離する方法が提案されている（特許文献 8 参照）。これらの熱処理条件では PHA の分子量は著しく低下するため、たとえ純度が向上したとしても製品への応用ができなくなる。

#### 【0007】

一方、物理的破碎を用いる方法として、高压破碎あるいは高压破碎とアルカリ添加を組み合わせた方法が報告されている（非特許文献 2、特許文献 9～11 参照）。非特許文献 2 には、ポリマーの純度や回収率の記載はないが、ポリ-3-ヒドロキシブチレート（PHB）含有菌体懸濁液にアルカリを添加した後、pH を中性に戻し高压破碎を行うため、菌体構成成分が PHB 画分に残存しており純度が高くないことが予想される。特許文献 9 ではアルカリを添加後 80℃に加熱し 1 時間攪拌後ポリマーを遠心で回収する方法、特許文献 10 では 70℃で高压破碎を行う方法、特許文献 11 では、非特許文献 2 を発展させた形と考えられる方法、すなわちアルカリを添加後に 70℃以上で高压破碎を行う方法が開示されている。これらの方法では、高温で処理を行うため条件によっては PHA の分子量が著しく低下する傾向が見られ、さらに純度も 66～85%程度と低く、実際の工業化プロセスには応用できない。

#### 【0008】

以上から、培養後の菌体から PHA を、低分子化することなく、且つ高純度で収率良く、工業的に安価に回収することは極めて困難であることが分かる。

#### 【0009】

ところで、溶媒抽出を用いない、すなわち、PHA 以外の菌体構成成分を化学的処理あるいは物理的処理によって可溶化させて除き PHA を顆粒体のまま回収する方法では、得られる PHA は通常直径数十ミクロンの微細な粒子である。このような微細な粒子を液体媒質から分離することは、より粒子が大きい場合に比べて困難である。さらに、これら微粒子は粉塵爆発を起こす危険性及び／又は吸引した場合の肺での蓄積などが考えられ、取扱に注意が必要である。これらの問

題を回避するためにPHAを凝集させ粒度を大きくする試みがなされており、例えば、加熱やアルカリ金属塩による凝集法などが開発されている。加熱させて凝集させる方法としては、PHB含有懸濁液を、PHBの融点付近(180℃)まで加熱して凝集させる方法がある(非特許文献4参照)。また、特許文献12では、水に懸濁したヒドロキシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシバレレート(3HV)の共重合体(以下、PHBVという)に、適切な温度と圧力の蒸気を直接注入し、120~160℃で加熱攪拌することによりPHBVの粒度を高める方法を開示している。これらの方法は高温で加熱する必要があるため、PHAの分子量低下が著しいこと、さらには耐圧性を持った特別な装置を必要とすることから、実用的でない。アルカリ金属塩を添加してPHAを凝集させる方法として、2価の陽イオンで凝集させる方法(非特許文献3、特許文献14)が開示されているが、これらの方法では、ポリマーの凝集強度が必ずしも強くないこと、ポリマーに金属塩が混入することなどから、好ましくない。超微細気泡をPHB懸濁液に吹き込むことでPHBを凝集させて、フロックを浮上させる方法も報告されている(非特許文献5参照)。しかし、これによってできる凝集体は2~45μmであり十分な大きさとはいえない。

#### 【0010】

このように、PHAの分子量低下を抑制し、且つ凝集を効果的に行う方法は知られていないのが実状である。

#### 【0011】

以上述べたように、微生物由来の生分解性ポリマーであるPHAの開発にあたっては、微生物細胞からのPHAの回収工程、さらに必要に応じてPHA粒子を凝集させる工程において、安価で且つ工業化に適した各工程プロセスが確立していないことが、実用化の大きな障害となっている。

#### 【0012】

##### 【特許文献1】

特開昭55-118394号公報

#### 【0013】

##### 【特許文献2】

特開昭57-65193号公報

【0014】

【特許文献3】

特開昭63-198991号公報

【0015】

【特許文献4】

特開平02-69187号公報

【0016】

【特許文献5】

特開平07-79788号公報

【0017】

【特許文献6】

特公平04-61638号公報

【0018】

【特許文献7】

特表平08-502415号公報

【0019】

【特許文献8】

特開平11-266891号公報

【0020】

【特許文献9】

特開平07-31487号公報

【0021】

【特許文献10】

特開平07-31488号公報

【0022】

【特許文献11】

特開平07-31489号公報

【0023】

## 【特許文献12】

特表平07-509131号公報

【0024】

## 【特許文献14】

特表平05-507410号公報

【0025】

## 【非特許文献1】

J. Gen. Microbiology, 1958年, 第19巻, p. 198-209

【0026】

## 【非特許文献2】

Bioseparation, 1991年, 第2巻, p. 95-105

【0027】

## 【非特許文献3】

J. Biotechnol., 1998年, 第65 (2, 3) 巻, p. 173-182

【0028】

## 【非特許文献4】

Bailey, Neil A. ; George, Neil ; Niranjana, K. ; Varley, Julie. Biochemical Engineering group, University Reading, 「IChemE Res. Event, Eur. Conf. Young Res. Chem. Eng.」, (英国), 第2版, Institution of Chemical Engineers, 1996年, 第1巻, p. 196-198

【0029】

## 【非特許文献5】

Spec. Publ. - R. Soc. Chem., 1994年, 158巻 (Separations for Biotechnology 3), p. 113-119

## 【0030】

## 【発明が解決しようとする課題】

上述したように、微生物細胞からのPHAの回収工程において、従来の方法では安価で且つ工業化に適したプロセスとはいえない。さらに本発明者らが予備検討した結果、上述したような次亜塩素酸、過酸化水素、酸、多量のアルカリなどの化学的処理や、高温下での反応が必要とされる従来の方法では、特にPHAが2種以上のモノマー成分からなる共重合体の場合に、単重合体であるPHBと比べて分子量がより著しく低下する傾向が見られ、到底利用できないことが判明した。

## 【0031】

従って、本発明の目的は、従来技術における上記の課題を解決し、培養したPHA含有微生物細胞からPHA粒子以外の細胞構成成分を効率よく除き、少ない工程数で深刻な分子量の低下を起こすことなく高純度のPHAを高収率で得ることのできるPHAの分離精製方法及びPHA粒子の凝集体を得る方法を提供することにある。

## 【0032】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、PHAの工業的に有利な微生物細胞からの回収方法について鋭意検討した。その結果、微生物を用いてPHAを生産したのち、PHAを含有する微生物細胞の水性懸濁液を比較的低温で攪拌と物理的破碎処理を行いながら、アルカリを添加し、続いて、PHAを回収し、該PHAを水性懸濁液あるいは湿潤状態で、酵素及び／又は界面活性化剤で処理し、さらに、該PHAを親水性溶媒で洗浄することによって、高純度で効率よくPHAを回収することが可能であることを見いだした。さらに、PHAを親水性溶媒に懸濁し、該懸濁液の沸点以下の温度で攪拌することにより凝集させることによって、PHAの粒度を大きくすることが可能であることも見いだした。これらの方法により、現在まで極めて困難であった分子量低下を回避し、純度99%以上のPHAを90%以上の収率で回収することに成功し、さらに、凝集することにより取り扱いの困難さ及び／又は粉塵爆発の危険性を回避するPHA製造法を完成するに至った。本発明の完

成により、微生物菌体由来の生分解性ポリマーの実用化が可能となる。

### 【0033】

すなわち本発明は、PHA含有微生物細胞からPHAを回収する方法であって、

(a) PHA含有微生物細胞の水性懸濁液に、攪拌と物理的破碎処理を行いながらアルカリを添加し、該細胞を破碎すると共に、該細胞中のPHA以外の細胞物質を可溶化あるいは乳化させ、次いでPHAを懸濁液から分離する工程；

(b) 分離されたPHAを、酵素及び／又は界面活性化剤で処理し、PHAに付着した不純物を可溶化又は分解後可溶化し、続いて親水性溶媒でPHAを洗浄する工程；

からなる微生物細胞からのPHAの回収方法に関する。

### 【0034】

さらに本発明は、PHA含有微生物細胞からPHAを回収する方法であって、

(a) PHA含有微生物細胞の水性懸濁液に、攪拌と物理的破碎処理を行いながらアルカリを添加し、該細胞を破碎すると共に、該細胞中のPHA以外の細胞物質を可溶化あるいは乳化させ、次いでPHAを懸濁液から分離する工程；

(b) 分離されたPHAを、酵素及び／又は界面活性化剤で処理し、PHAに付着した不純物を可溶化又は分解後可溶化し、続いて親水性溶媒でPHAを洗浄する工程；

(c) 洗浄されたPHAを、親水性溶媒に懸濁し、該懸濁液の沸点以下の温度で攪拌することによりPHAを凝集させて粒度を大きくし、次いで凝集したPHAを懸濁液から分離する工程；

からなる微生物細胞からのPHAの回収方法に関する。

### 【0035】

#### 【発明の実施の形態】

以下に好ましい実施の態様を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

### 【0036】

本発明におけるPHAとは、ヒドロキシアルカノエートの重合体の総称である。ヒドロキシアルカノエート成分としては特に限定されないが、具体的には、3

ーヒドロキシブチレート (3HB)、3ーヒドロキシバレレート (3HV)、3ーヒドロキシプロピオネート、4ーヒドロキシブチレート (3HH)、4ーヒドロキシバレレート、5ーヒドロキシバレレート、3ーヒドロキシペンテノエート、3ーヒドロキシヘキサノエート、3ーヒドロキシヘプタノエート、3ーヒドロキシオクタノエート、3ーヒドロキシノナエート、3ーヒドロキシドカネートなどが挙げられる。本発明におけるPHAは、これらヒドロキシアルカノエートの単重合体であっても、2種以上が共重合した共重合体であってもよい。特に、従来の方法では分子量が低下しやすい傾向にある共重合体の場合、後述するように本発明では分子量がほとんど低下しないという点で適している。ポリヒドロキシアルカノエートの具体例としては、3HBの単重合体であるPHBや、3HBと3HVの2成分共重合体であるPHBV、3HBと3HHとの2成分共重合体（特許第2777757号公報参照）または、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体PHBHV（特許第277757号公報参照）などが例示できる。特に、生分解性ポリマーとしての分解性と、柔らかい性質を持つ点で、モノマーユニットとして3HHを有する共重合体が好ましく、より好ましくは、PHBHである。このときPHBHを構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、良好な加工性を示す点から3HHユニットが1～99mol%のものが好ましく、より好ましくは3～30%である。また、PHBHVの場合、構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニットの含量は1～95mol%、3HVユニットの含量は1～96mol%、3HHユニットの含量は1～30mol%といった範囲のものが好適である。

#### 【0037】

PHAが実用化できるためには、PHAはゲルクロマトグラフィー法でポリスチレンを分子量標準とした重量平均分子量1万以上を有しなければならない。好ましくは5万以上、より好ましくは10万以上、特に20万以上である。

#### 【0038】

本発明に用いられる微生物は、細胞内にPHAを蓄積することが可能な微生物であれば特に限定されない。例えば、*Alcaligenes lipolyticus*

*Alcaligenes latus*等のアルカリゲネス属、*Ralstonia eutropha*などのラルストニア属、シュウドモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*) などの微生物は、培養条件を調整することによってPHAを細胞内に蓄積することが可能である。また、これら微生物のPHA合成に関与する遺伝子群を導入した形質転換体であっても良い。その場合、宿主としては特に限定されず、上記微生物の他、大腸菌などの菌が挙げられる。このなかで、アエロモナス属の*A. caviae*や、該*A. caviae*のPHA合成酵素群の遺伝子を導入した形質転換体が、ポリマーとして優れたPHBHを合成できる能力があるという点で好ましい。特に、*A. caviae*のPHA合成酵素群の遺伝子を導入した*Ralstonia eutropha*がより好ましく、該微生物の1例は、*Alcaligenes eutrophus* AC32として、独立法人産業技術総合研究所に寄託されている (FERM BP-6038) )。

#### 【0039】

本発明においては、上述した微生物を適切な条件で培養してその細胞内にPHAを蓄積させた微生物細胞を用いる。その培養方法については特に限定されないが、例えば特開2001-340078号公報に示した当業者に周知の方法が用いられる。

#### 【0040】

PHAを回収するうえにおいて、培養後の微生物細胞中のPHA含有率は、高い方が好ましいのは当然であり、工業レベルでの適用においては乾燥細胞中に50重量%以上のPHAが含有されているのが好ましく、以後の分離操作、分離ポリマーの純度等を考慮するとより好ましいPHA含有率は60重量%以上、さらには70重量%以上である。培養完了後は直接工程(a)へ進むこともできるが、遠心や膜分離など当業者に周知の方法により菌体を回収した後、あるいは、加熱などにより菌体を死滅した後に菌体を回収し、その後、工程(a)へ進むことができる。ここで、加熱する場合の温度は50℃～70℃が好ましい。



本発明における工程 (a) では、P H A 含有微生物細胞の水性懸濁液の攪拌と物理的破碎処理を行いながら、該水性懸濁液にアルカリを添加することが重要である。すなわち、実際には、① P H A 含有微生物細胞の水性懸濁液を調整し、② 該水性懸濁液を攪拌しつつ物理的破碎処理をまず開始し、③ 次に、攪拌と物理的破碎処理を継続しながらアルカリを添加する、というプロセスである。物理的破碎を行わず菌体懸濁液にアルカリを添加すると、微生物細胞から P H A と一緒に核酸や菌体細胞壁、細胞膜、不溶性蛋白質などが流出する。本発明者らは、この時、特に遊離した核酸によって懸濁液の粘度が激しく上昇し、条件によっては、懸濁液の攪拌さえできなくなり、P H A の回収が不可能となることを経験した。また、本発明者等は、P H A 回収時に先にアルカリを添加し懸濁液の p H を 10 以上にした後、物理的破碎 (例えば高圧ホモジナイザーによる菌体破碎と乳化) すると P H A の分解が生じやすく、逆に物理的破碎を先に行うと意外にも P H A の分解が生じにくいことを見いだした。そこで本発明では、物理的破碎を行いながら徐々にアルカリを添加し、不溶物質の可溶化あるいは乳化を進めることによって、P H A が分解されることなく、不溶物質から容易に分離・回収できるようになる。

#### 【0041】

本発明において、物理的破碎処理を行う装置としては、特に限定されないが、高圧ホモジナイザー、超音波破碎機、乳化分散機、ビーズミル等が挙げられる。特に高圧ホモジナイザーの使用が好ましく、ポリマーの水性懸濁液が微小開口部を有する耐圧性容器に導入され高圧をかけられることにより開口部から押し出されるタイプがより好ましい。このような装置では微生物細胞には大きな剪断力が働くため、微生物細胞は効率的に破壊されポリマーの分離が促進される。このような機器は開口部で高圧がかかり、瞬間的に高温になるため、必要に応じて、一般の低温恒温循環槽により微生物細胞含有懸濁液を冷却し、温度の上昇を防ぎ、20～40℃での破碎処理を行うのが好ましい。このような比較的低温下で処理を行った場合には、P H A の分子量はほとんど低下しない。従って本発明の好ましい実施態様では、20～40℃で物理的破碎を行いながらアルカリを添加していく方法が好ましい。このような耐圧性容器と加圧機構からなる装置は、例えば

、伊国ニロソアビ社製高圧ホモジナイザーが好ましく用いられる。また、ブランリューベ連続式細胞破碎機（独国B r a n + L u e b b e社製）、マイクロフルイダイザー（米国M i c r o f l u i d i c s社製）等も用いることができる。

#### 【0042】

工程（a）で使用するアルカリは、P H A含有微生物の細胞壁を破壊して該細胞中のP H Aを細胞外に流出できるものであれば特に限定されるものではなく、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等を含めたアルカリ金属の水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属の炭酸塩、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ金属の炭酸水素塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の有機酸のアルカリ金属塩、ホウ砂等のアルカリ金属のホウ酸塩、リン酸3ナトリウム、リン酸水素2ナトリウム、リン酸3カリウム、リン酸水素2カリウム等のアルカリ金属のリン酸塩、水酸化バリウムなどのアルカリ土類金属の水酸化物あるいはアンモニア水等が挙げられるがこれらに制限されるものではない。この中でも、工業生産に適し、また価格の点で、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウムなどが好ましい。

#### 【0043】

本発明の工程（a）においては、アルカリ添加時にp Hをコントロールすることが好ましい。ポリマー以外の菌体由来の不溶物を効果的に可溶化でき、かつP H A自体には悪影響をあまり与えない好ましいp Hの範囲はp H 9～13.5, さらに好ましくはp H 10～13の範囲である。p Hが13.5より上ではP H Aの分子量の低下傾向が激しく、p Hが9未満では破碎効果は低下する傾向がある。コントロールするp Hの上下幅としては設定値の上下それぞれ1以内が好ましく、更に好ましくは上下それぞれ0.5以内である。このようにp Hをコントロールするためには、微生物細胞の懸濁液に、アルカリを、p Hを所望の値にコントロールしながら連続的あるいは断続的に添加する方法が採用できる。本発明においてこのようにp Hをコントロールすることで、一度にアルカリを添加する場合のようにp Hが高くなりすぎたりするのを防ぐと同時に、常にある程度以上のアルカリ条件を維持することで懸濁液を高温にする必要がなくなり、結果、P H Aの分子量低下を防ぐことが可能となる。

## 【0044】

また、(a) 工程での微生物細胞の懸濁濃度は、乾燥菌体換算で  $500\text{ g/l}$  以下が好ましく、さらに好ましくは微生物細胞懸濁液の攪拌のしやすさから  $300\text{ g/l}$  以下である。

## 【0045】

以下、工程 (a) を行うための好ましい装置の概略図である図 1 を用いて、工程 (a) をより詳細に説明する。勿論本発明はこれら装置例に限定されるものではない。

## 【0046】

図 1 における符号 1 は全体で本発明の菌体破碎装置を示している。図 1 における符号 6 はアルカリの薬剤を貯留するための pH 調整剤貯留槽であり、該 pH 調整剤貯留槽 6 内の薬剤が、ポンプ 4 によって管路 5 を介して菌体破碎槽 11 に供給され、菌体破碎槽 11 内の微生物細胞懸濁液の pH を必要に応じて調整する。さらに、菌体破碎槽 11 には pH 調整剤貯留槽 6 より供給された pH 調整剤を、菌体破碎槽 11 内の微生物細胞懸濁液に均一に攪拌混合するための攪拌装置 2 が付設されている。また、菌体破碎槽 11 には、菌体破碎槽 11 内の微生物細胞懸濁液の pH を検知して、所定の pH となるように、ポンプ 4 の供給量を制御するために、pH 計 7 と pH 検知制御装置 3 から構成される pH 検知制御手段が付設されている。ここで菌体破碎槽 11 は低温恒温循環槽を兼ねており、微生物細胞懸濁液を所望の温度に一定に保つことができる。

## 【0047】

図 1 において、菌体破碎槽 11 内の微生物細胞懸濁液は、ポンプ 10 を介して破碎装置 9 に供給され、該破碎装置 9 により粘度上昇の原因となる核酸を効率よく破碎し、管路 8 を介して菌体破碎槽 11 内へ供給するようになっている。攪拌装置 2 によって添加されたアルカリは速やかに拡散し、微生物細胞懸濁液が均一となり、微生物細胞懸濁液の pH を厳密に調整できるようになっている。ここで、攪拌が十分に行なわれないと、アルカリ濃度が部分的に高濃度となりポリマーが加水分解を受け、分子量が低下する。

## 【0048】

破碎装置 9 には、上述したような高圧ホモジナイザー、超音波破碎機、乳化分散機、ビーズミル等の装置を使用できる。また、同種あるいは異種の破碎機を 2 基以上並列或いは直列に設置しても良い。攪拌装置 2 には、添加したアルカリを効率よく拡散し、且つ流出した高粘度の DNA を効率よく破碎する必要があるため、乳化分散機や超音波破碎機の使用が好ましい。特に、乳化分散機が好ましく英国シルバーソン社製シルバーソンミキサー、日本国エムテック社製クリアミックス、日本国エバラ社製エバラマイルダー等が使用できるが、これらに限定されるわけではない。これら機器にはインラインミキサータイプが製造されており、例えば、これらは図 1 のポンプ 10 と攪拌装置 2 を兼用することもでき、この場合構造が簡便になる利点がある。また、pH 計 7 や pH 検知制御装置は汎用機器を使用すればよい。

#### 【0049】

発明者らは、予備検討において、微生物細胞からの PHA の分離精製において、従来の特開平 7-31487 や特開平 7-31489、公知文献 (Harrison ST 等、Bioseparation (1991 年) 2 巻: 95-105) で実施されている方法を PHBH について検討した。これらの従来法は、微生物細胞に対してアルカリを最初にしかも一度に添加する方法である。その結果、アルカリ添加直後に PHBH が高濃度のアルカリと接触し、分解を受け低分子化した。しかも反応が進むにつれ遊離してきた蛋白質や核酸によりアルカリが消費されて pH が低下し、溶解物の再沈殿化が起こる。その結果 PHBH と不溶物を分離することができずポリマー純度が向上しないことが明らかとなった。さらに、純度を向上させるためにはこれら特許文献の実施例のように 80℃ 程度の熱をかけなければ精製度が向上せず (純度 85%)、そのため PHBH の分子量が 50% ほど激しく低下することは免れなかった。

#### 【0050】

それに対し、本発明の方法では pH 9 ~ 12 の任意の pH に維持しながら高圧破碎などの物理的破碎を行うため、温度が 20 ~ 40℃ という低温での処理が可能になり、分子量低下が PHBH の場合でも 10% 以下に抑えられることが分かった。これは本法の最も望ましい特性である。このように、最も好適なアルカリ

環境下で微生物細胞が破碎されるので再現性のある結果を得ることが可能である。

#### 【0051】

本発明における工程 (b) は、酵素及び界面活性化剤のいずれかあるいはこれらを併用して処理する PHA の精製法である。従来もこれらの処理方法は単独で或いは他の PHA 回収方法と併用して用いられていたが、あまり良好な結果は得られていない。本発明においては工程 (a) で得られた比較的純度の高い PHA に対して、これらの処理方法を行うことで、後述するようなより顕著な効果が得られることを見いだした。

#### 【0052】

工程 (a) で得られる PHA 粒子には、普通、蛋白質類、菌体細胞壁成分であるペプチドグリカン、脂質類、多糖類、核酸類、その他の炭水化物類が吸着していると考えられる。本発明における工程 (b) では、上記吸着成分の少なくとも幾つかを除去し PHA の純度を高めることを目的として行われる。

#### 【0053】

本発明において、工程 (a) で得られた PHA を一旦乾燥し、工程 (b) に使用すると、該 PHA はもはや水には浸潤せず工程 (b) での処理効果はあまり得られないことがわかった。従って、本発明においては、特に限定されるわけではないが、工程 (a) で分離された PHA を水に懸濁したまま、あるいは、例えば遠心や膜分離により分離後回収した後の水に湿潤した状態のまま次の工程 (b) に移るのが好ましい。

#### 【0054】

工程 (b) において酵素による処理を行う場合、使用される酵素の例としては、蛋白質分解酵素、脂肪酸類分解酵素、細胞壁分解酵素、DNA 分解酵素などが挙げられる。これらの酵素の具体例としては下記の酵素があげられる。

##### (1) 蛋白質分解酵素 (プロテアーゼ)

アルカラーゼ、ペプシン、トリプシン、パパイン、キモトリプシン、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ

##### (2)、脂肪酸類分解酵素

リパーゼ類、ホスホリパーゼ類、コリンエステラーゼ類、ホスファターゼ類

(3) 細胞壁分解酵素

リゾチーム、アミラーゼ、セルラーゼ、マルターゼ、サッカラーゼ、 $\alpha$  及び  $\beta$ -グリコシナーゼ

(4) DNA分解酵素

リボヌクレアーゼ類

本工程で用いられる酵素は、上記のものに限定されるわけではなく、工業的な製品に用いられ得るものであれば、任意の酵素であってよい。さらには、例えば酵素と酵素の安定化剤や界面活性化剤、あるいは再汚染防止剤などを含有する酵素組成物であってもよく、酵素のみには限定されない。また、一般に市販されている洗濯用酵素洗剤なども含まれる。酵素として、PHAに付着した不溶性蛋白質や不溶性のペプチドグリカンを分解除去する目的においては、蛋白質分解酵素と細胞壁分解酵素から選ばれる1種以上が好ましく、蛋白質分解酵素がより好ましい。蛋白質分解酵素としては、特に限定はしないが、プロテアーゼA、プロテアーゼP、プロテアーゼN（以上、天野エンザイム社製）、アルカラーゼ、ザビナーゼ、エバラーゼ（以上、ノボザイム社製）等が工業的に使用可能であり、分解活性の点からも好適に使用できる。また、細胞壁分解酵素ではリゾチームの使用が好ましいが、これに限られるものではない。好ましい実施態様では、これら酵素による処理を界面活性化剤の存在下に行うのがより高い精製効果が得られる点で望ましい。

【0055】

酵素処理工程を採用する場合、その処理は当然酵素が変性する温度よりも低い温度で実施されるべきである。多くの場合、酵素の変性温度は65℃よりも低い。いくつかの酵素については変性温度が65℃よりも高く、従ってそのような酵素を用いるときには65℃よりも高い消化温度を使用することが可能であるが、高温でのPHAの分子量低下を考慮した場合、その処理温度は50℃以下で行なうのが好ましく、特に20℃～55℃が好ましい。酵素処理時間は所要の処理度を達成するまで維持することによって行なうのが好ましく、この時間は通常0.5～2時間である。酵素の必要量は、酵素の種類及び活性に依存する。特に制限

はされないが、ポリマー重量 100 重量部に対して、0.001～10 重量部が好ましく、さらにはコストの点から 5 重量部以下がより好ましい。本発明の方法は、PHA を含有する菌体そのものを酵素処理して、菌体を破碎する従来の方法（特許文献 6 参照）に比較して、PHA 中にわずかに残った不溶物を可溶化するに足る酵素量を添加すれば良いため経済的に安価に製造できる利点がある。

#### 【0056】

本発明における工程（b）では、PHA 粒子に付着した不純物を除去するために可溶化剤として界面活性剤を使用することも可能である。本発明で使用する界面活性剤としては、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤が挙げられる。洗浄性の点で好ましくは陰イオン界面活性剤及び又は非イオン界面活性剤である。蛋白質などを洗浄・除去する目的においては、陰イオン界面活性剤を用いることが好ましく、また、脂肪酸や油脂を洗浄・除去する目的、あるいは、酵素を併用する場合には、非イオン界面活性剤を用いることが好ましい。また陰イオン界面活性剤及び非イオン界面活性剤の両方を含有してもかまわない。両方を含有する場合、陰イオン界面活性剤／非イオン界面活性剤の重量比は 1/100～100/10 が好ましく、5/100～100/20 がより好ましい。特に、5/100～100/100、更に 5/100～50/100 が好ましい。陰イオン界面活性剤としては、アルキル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル又はアルケニル硫酸エステル塩、アルキル又はアルケニルエーテル硫酸エステル塩、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸塩、 $\alpha$ -スルホ脂肪酸塩又はこのエステル、アルキル又はアルケニルエーテルカルボン酸塩、アミノ酸型界面活性剤、N-アシルアミノ酸型界面活性剤等が挙げられる。特にアルキル基の炭素数が 12～14 のアルキル硫酸塩、アルキル基の炭素数が 12～16 の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル基の炭素数が 10～18 のアルキル硫酸エステル塩又はアルキルエーテル硫酸エステル塩が挙げられ、対イオンとしてはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、マグネシウム等のアルカリ土類金属、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等のアルカノールアミンが好ましいが、これらに限られるわけではない。

## 【0057】

非イオン界面活性化剤としては、ポリオキシアルキレン（好ましくはオキシエチレン）アルキル又はアルケニルエーテル、ポリオキシアルキレン（好ましくはオキシエチレン）アルキル又はアルケニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキル又はアルケニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルアミン、高級脂肪酸アルカノールアミド、アルキルグルコシド、アルキルグルコースアミド、アルキルアミンオキサイド等が挙げられる。中でも親水性の高いもの及び水と混和した際に生じる液晶の形成能の低い若しくは液晶を生じないものが好ましく、また、生分解性が比較的良好である点で、炭素数10～14のポリオキシアルキルエーテルや炭素数10～14のポリオキシエチレンアルキルエーテル、再汚染防止剤としてポリエチレングリコールなどの使用が好ましいが、これに限られるわけではない

陽イオン界面活性化剤としては、アルキルトリメチルアンモニウム塩、ジアルキルジメチルアンモニウム塩等が挙げられる。

## 【0058】

両性界面活性化剤としては、カルボベタイン型、スルホベタイン型等が挙げられる。

## 【0059】

上述した界面活性化剤から具体的には、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、炭素数10～14のポリオキシエチレンアルキルエーテルなどが価格、使用量や添加効果の点で好ましく、またこれらを2種以上併用して用いることも好ましい。

## 【0060】

以上挙げた界面活性化剤は一般に市販されている洗濯用洗剤に使用されているものであり、適当な洗濯用洗剤を使用することにより本発明の課題を達成することができる。界面活性化剤の添加量は、特に制限されないが、ポリマー重量100重量部に対して、0.001～10重量部が好ましく、さらにはコストの点か



ら、5重量部以下が好ましい。また、得られた混合液は、PHA以外の菌体構成成分の可溶化を促進させる観点から、室温下で1分～2時間程度攪拌することが好ましい。また、界面活性化剤処理における処理温度は特に限定されないが、20～55℃の範囲が好ましい。

#### 【0061】

本発明の好ましい実施態様として、界面活性化剤を酵素処理と併用して使用することが挙げられる。本発明者らは、2剤併用の顕著な効果を認めており、その理由として酵素分解により遊離し不溶性となった分解物を界面活性化剤が効果的に除去するからではないかと考えられる。この場合、界面活性化剤と酵素を別々に調整し適宜混合して用いることができるが、市販の酵素配合洗濯用洗剤は界面活性剤と酵素の混合物であることから、これをそのまま使用することもできる。

#### 【0062】

本発明の(b)工程において、酵素、界面活性剤のどの処理を行うかは、特に除去したい不純物の種類、コスト、その他プロセス上の制約、目的とするPHAの純度、などの理由や目的によって適宜自由に選択できる。酵素処理はいくつかの段階に分けて実施してよく、例えば最初の段階では1つの酵素を用い、次いで同一または異なる酵素を用いてもよい。また一種以上の酵素を使用する場合には、互いに消化し合わなければそれらを混合した酵素を用いて1段階でPHAを処理するのが便利である。また上述したように界面活性化剤と酵素処理を同時に行っても良い。

#### 【0063】

本発明では、工程(b)で上記の処理により得られたPHA粒子は、脱脂・脱臭・脱色のために、親水性溶媒による洗浄を行う。用いられる親水性溶媒としては特に限定されないが、具体的にはメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、水などが挙げられる。これらの中で、経済的に安価で洗浄効果のあるメタノールとエタノールが特に好ましく、これらを水と混合して使用しても良い。水と親水性溶媒の混合液を用いる場合、水との混合比は4/6～0.5/9.5程度が好ましい。これらの溶媒で洗浄することにより、より純度の向上したPHAを単離することができる。

## 【0064】

本発明においては、この工程（b）が終了した段階でPHAを回収し、成形材料として使用することが可能である。しかし、工程（b）で得られたPHAは粒径が数ミクロン程度と非常に細かい微粒子であり、これを液体媒質から分離することはより粒子が大きい場合に比べて困難となる場合があること、さらに、微粒子は粉塵爆発を起こす危険性及び／又は吸引した場合の肺での蓄積などが考えられ、取扱に注意が必要であることなどから、さらに以下の工程（c）において、PHAを適当な粒径にまで凝集させることが望ましい。

## 【0065】

本発明の工程（c）では、工程（b）によって精製されたPHAを、親水性溶媒に懸濁し、該懸濁液をその沸点以下の温度で攪拌するといった簡便な操作によってPHA粒子を凝集させ、その粒径を大きくする工程である。ここで使用する親水性溶媒としては特に限定されるものではないが、例えばメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、ブタノールなどのアルコール類、アセトンやメチルエチルケトンなどのケトン類、テトラヒドロフラン、ジオキサンなどのエーテル類、アセトニトリルやプロピオニトリルなどのニトリル類、ジメチルホルムアミドやアセトアミドなどのアミド類、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ピペリジン、水などが挙げられる。好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、ブタノール、アセトン、メチルエチルケトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、アセトニトリル、プロピオニトリルなどが溶媒の除去性が良好である点から好適である。さらに好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、ブタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルなどが入手が容易であることから好ましい。さらに好ましくは、工程（b）のPHA洗浄に用いた溶媒を使用することが、連続的に凝集操作に移れること、溶媒槽が1種類で賄えることから設備費の削減ができるなどの点で好ましい。従って、好ましい溶媒はメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフランなどが挙げられ、これらの中で、経済的に安価でかつ洗浄効果のあるメタノールとエタノールが特に好ましく、またこれらを水と混合して用いても良い。

## 【0066】

工程(c)の懸濁液中のPHAの濃度は特に限定されないが、好ましくは1 g/L以上、より好ましくは10 g/L以上、さらに好ましくは30 g/L以上である。また、上限はPHA懸濁液の流動性を確保する点から、好ましくは500 g/L以下、より好ましくは300 g/L以下、さらに好ましくは200 g/L以下である。懸濁液は、その媒質として親水性溶媒のみからなるもの、又はそれを含有する混合液体からなるものであってもよく、好ましくは水との混合液体である。混合液体中の親水性溶媒の濃度は、より十分な凝集効果を得るために、好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上である。また、親水性溶媒の上限は99%以下、好ましくは98%以下、より好ましくは97%以下である。本発明の工程(c)において攪拌する手段としては、攪拌槽など、乱流を生じさせるものが挙げられるが、特に限定されるものではない。

## 【0067】

本発明の工程(c)における、凝集時の温度は室温以上が好ましく、40℃以上がより好ましく、さらには60℃以上が好ましい。上限は特に限定されず、該懸濁液の沸点までの任意の温度を選択できる。本法は常圧あるいは高圧いずれの条件でも行なうことができる。本発明の方法では、通常、数分程度の極めて短時間で凝集を起こさせることができるため、温度による分子量低下については心配する必要がない。本発明の凝集方法によって、PHAの粒径を高めることが可能となる。例えば、重量平均直径が50 μm以上、好ましくは100 μm以上、より好ましくは200 μm以上の凝集体を得ることができる。上限は特に限定されないが、重量平均直径が5000 μm以下、好ましくは3000 μm以下の凝集体である。粒径の増大に伴い濾過による回収が容易になり、工業生産において設備費が軽減できることになる。

## 【0068】

本発明によって得られるPHAには、必要に応じて、顔料、染料などの着色剤、無機系または有機系粒子、ガラス繊維、ウイスキー、雲母などの充填剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤などの安定剤、滑剤、離型剤、撥水剤、抗菌剤その他の副次的添加剤を配合することができる。

## 【0069】

本発明の方法によって得られるPHA樹脂組成物は、各種繊維、糸、ロープ、織物、編物、不織布、紙、フィルム、シート、チューブ、板、棒、容器、袋、部品、発泡体などの形状に成形できる。また、2軸延伸フィルムにも加工できる。成形品は、農業、漁業、林業、園芸、医学、衛生品、衣料、非衣料、包装、その他の分野に好適に用いることができる。特に、本発明の方法によって得られるPHAは非常に高純度であることから、今までの方法では使用できなかった高い純度を要求される分野、例えばフィルム、医学、衛生品、などに好適に利用できるという点で優れている。

## 【0070】

以上、本発明において、今まで非常に困難であったPHA含有微生物細胞中より、高純度PHAを効率よく回収することができ、PHAを工業的に安価に生産、提供できるようになる。

## 【0071】

## 【実施例】

PHAとしてPHBHを用い、以下の実施例で本発明を更に説明するが、これらは本発明をなんら限定するものではない。

## 【0072】

(3HHmol%の測定方法)

培養終了後の微生物細胞中のPHA (PHBH) を、クロロホルム抽出とヘキサン晶析により回収後、解析に供した。3HHmol%の測定は特開2001-340078の実施例1に記載の方法で行った。すなわち、PHBHを2mlの硫酸-メタノール混液(15:85)に懸濁させ、クロロホルム2mlを加え、100℃、140分間加熱した。冷却後、1mlの蒸留水を添加し、攪拌後クロロホルム層を回収した。これを島津製作所製ガスクロマトグラフGC-17A (GLサイエンス社製NEUTRA BONDカラム) を用いて組成分析を行った。

## 【0073】

(PHA中の残留窒素量の測定方法)

回収した PHA (PHBH) を測定直前に 50℃ で 5 時間減圧乾燥し、ダイヤ  
インスツルメンツ社製の微量窒素分析装置 TN-10 を用いて全窒素量を測定し  
た。本発明では、測定した窒素濃度に 6.38 を乗じて蛋白質換算とした。

#### 【0074】

(PHA の平均分子量の測定方法)

回収した乾燥 PHA 10mg を、クロロホルム 5ml に溶解したのち、不溶物  
を濾過により除いた。この溶液を Shodex K805L (300 x 8mm、  
2 本連結) (昭和電工社製) を装着した島津製作所製 GPC システムを用いクロ  
ロホルムを移動相として分析した。分子量標準サンプルには市販の標準ポリスチ  
レンを用いた。培養終了後の微生物細胞中の PHA の分子量については、上記 3  
HHmol% の測定と同じく、PHA 含有微生物細胞からクロロホルム抽出とヘ  
キサン晶析により PHA を回収して、同様に測定した。

#### 【0075】

(粒度の測定)

PHA 粒子の平均粒径は、マイクロトラック粒度計 (日機装製、FRA) を用  
い、PHA の水懸濁液を所定濃度に調整し、全粒子の 50% 蓄積量に対応する粒  
径を平均粒径とした。

#### 【0076】

(実施例 1)

以下に本発明の PHA 回収・精製方法を記すが、もちろんこれに限定されるわ  
けではない。

#### 【0077】

(実施例 1) 工程 (a) 処理

アエロモナス・キャビエ由来の PHA 合成酵素群遺伝子を導入した *R. eut  
ropha* (寄託番号 FERM BP-6038) を特開 2001-3400  
78 の実施例 1 に記載した方法で培養を行い、PHBH の生産を行った。培養終  
了後遠心により微生物細胞を回収し、乾燥菌体重量で 100g/L の水性懸濁液  
とした。回収微生物細胞中の PHBH の平均分子量は 140 万、3HH 組成は 6  
8mol% であった。この水性懸濁液を図 1 (A) の菌体破碎装置を用いてア

ルカリ条件下による菌体の物理的破碎を行った。菌体破碎槽 11 に PHA 含有微生物細胞の水性懸濁液 600 ml を入れ、反応槽を伊国ニロソアビ社製高圧ホモジナイザーモデル PA2K 型（破碎装置 9）と連結し 600~700 kgf/cm<sup>2</sup> の圧力でホモジナイズを行った。10 分後から 10% の水酸化ナトリウムを徐々に添加することにより細胞水性懸濁液を pH 12.5 に調製し、この pH を維持しながら懸濁液を破碎槽 11 と破碎装置 9 の間で循環させた。この間、菌体破碎槽の温度を恒温循環ポンプにより 30℃ に保った。pH コントロールは pH 電極（pH 計 7）を菌体破碎槽の懸濁液に浸し丸菱バイオエンジニアリング社製ラボコントローラー MDL-6C 型（pH 検知制御装置 3）に接続し、該懸濁液の pH が設定値以下になるとペリスタポンプ（ポンプ 4）が作動し水酸化ナトリウム水溶液が設定値に達するまで該懸濁液内に入るように設定した。破碎槽と破碎装置の間を 20 回循環させた後、懸濁液を遠心分離（9500g、30 分）して PHBH 画分を得た。遠心分離により得られた PHBH 画分を水で 2 回洗浄し、最後に乾燥 PHBH 重量で 100 g/L の水性懸濁液にし、次工程に用いた。

#### 【0078】

##### （実施例 2）工程（b）処理

実施例 1 で得られた PHBH 懸濁液各 60 ml に、次の被検試剤を加えた。なお、以下の被検試剤の添加量は、すべて懸濁液中のポリマー重量に対する重量%である。

#### 【0079】

- ① ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（Wako Pure Chemical 社製）を 5 重量%
- ② プロテアーゼ N（天野エンザイム社製）を 0.08 重量%
- ③ SDS を 5 重量% と プロテアーゼ N を 0.08 重量%
- ④ SDS を 5 重量% と 卵白リゾチーム（Wako Pure Chemical 社製）0.08 重量%
- ⑤ SDS を 5 重量% と プロテアーゼ N を 0.08 重量% と リゾチーム 0.08 重量%
- ⑥ 洗濯用合成洗剤アタック（花王株式会社製）5 重量%（酵素成分が約 0.

5重量%含まれている計算)

それぞれの該懸濁液をpH7.0、50℃、1時間攪拌した。その後PHBHを遠心により回収し、水60mlで2回洗浄後、エタノール60mlで2回洗浄し、50℃で減圧下に乾燥し、PHBH粉体を得た。尚、実施例1で得られたPHBHをエタノールで2回洗浄後、減圧下に乾燥し得られたPHBH粉体を無処理サンプルとした。結果を表1に示した。PHBHは工程(b)により99.5%以上の純度を示し、無処理と比較し効果が確認できた。SDS単独でも効果があるが、酵素と併用することでさらに純度が向上した。また、市販の合成洗剤も効果が高く、安価であることから利用が好ましいと判断される。

【0080】

【表1】

サンプル	全窒素量 $\mu\text{g/g}$	総蛋白量 $\text{mg/g}$	PHA純度(%)
無処理	5500	35.09	96.49
① SDS	600	3.83	99.62
② プロテアーゼN	540	3.45	99.66
③ SDS+プロテアーゼN	130	0.83	99.92
④ SDS+リゾチーム	690	0.44	99.96
⑤ SDS+プロテアーゼN+ リゾチーム	110	0.70	99.93
⑥ アタック	190	1.21	99.88

【0081】

(実施例3) トータルフロー((a)工程～(c)工程)で実施

実施例1と同様にして培養した*R. eutropha*を遠心により回収した。この菌体を乾燥重量で100g/Lの水性懸濁液とした。回収菌体中のPHBHの平均分子量は約147万、3HH組成は5.1mol%であった。この懸濁液400mlを用い実施例1に記載の方法に従ってpHを約12.5に維持しながら高圧破碎を行った。処理終了後、遠心によりPHBH画分を回収し、これを水で2回洗浄した。得られたPHBH画分をポリマーの乾燥重量で100g/Lの水懸濁液とした。この懸濁液にプロテアーゼNを、ポリマー重量に対して0.2重量%、リゾチームを0.2重量%、SDSを4重量%を添加し、pH7.0、

50℃で1時間攪拌した。処理終了後、PHBHの水による洗浄を2回行った。親水性溶媒による洗浄は行わなかった。得られたPHBH画分を200g/Lの水性懸濁液とした。当該懸濁液に95%エタノール290mlを加えて懸濁させ、続いて遠心によりPHBHを沈殿させた。上清290mlを除去し、ポリマー画分に再度95%エタノール290mlを加えてPHBHを懸濁させた。このエタノール洗浄を計2回行った後、95%エタノール290mlを加えた懸濁液とした。該PHBH懸濁液を70℃の95%エタノール290mlに15分間で徐々に加え、添加終了時からさらに10分攪拌を行いPHBHを凝集させた。凝集PHBHを桐山濾紙（No58）（桐山製作所製）を使用し濾過による回収を行った。濾紙上のPHBHを95%エタノール120ml（PHBH容量と等量）で2回洗浄した。得られたPHBHを50℃で真空乾燥した。PHBHの純度解析結果を表9に示した。この結果純度99.9%のPHBHが56g（回収率93%）得られた。また、平均分子量は142万とわずか3.4%減少したのみであった。

【0082】

【表2】

PHBH	全窒素量 $\mu\text{g/g}$	総蛋白量 $\text{mg/g}$	純度 (%)	粒度 $\mu\text{m}$	分子量 $\times 10^4 (-6)$
回収前	—	—	—	7.5	1.47
最終回収品	140	0.89	99.91	203	1.42

【0083】

## 【発明の効果】

本発明の方法において、ポリヒドロキシアルカノエート産生微生物菌体細胞中より凝集させたポリヒドロキシアルカノエートを高純度に効率よく回収できるようになり、工業的に安価に生産、提供できるようになる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の分離精製を実施するための菌体破碎装置の説明図である。

## 【符号の説明】

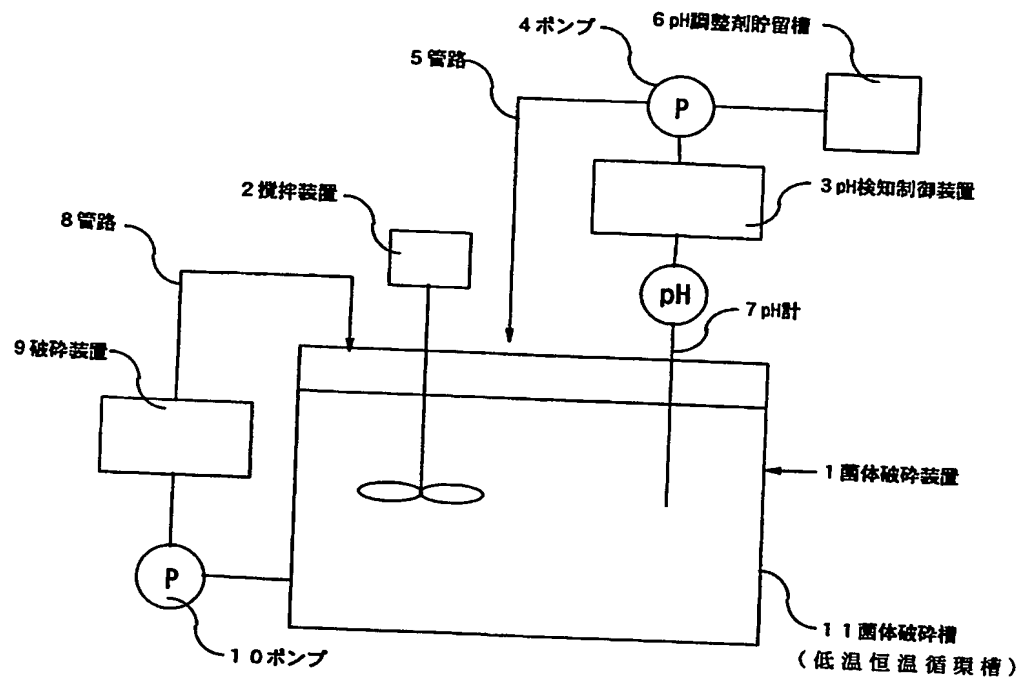


- 1 菌体破碎装置
- 2 攪拌装置
- 3 p H 検知制御装置
- 4 ポンプ
- 5 管路
- 6 p H 調整剤貯留槽
- 7 p H 計
- 8 管路
- 9 破碎装置
- 1 0 ポンプ
- 1 1 菌体破碎槽
- 1 2 破碎装置

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 P H A 含有微生物菌体から P H A 粒子以外の菌体構成成分を効率よく除き、深刻な分子量の低下を起こすことなく高純度の P H A を高収率で得ることのできる P H A の分離・精製方法及び P H A 粒子の凝集体を得る方法を提供すること。

【解決手段】 P H A 含有微生物細胞の水性懸濁液を、低温で物理的破碎処理とアルカリ添加を行うことにより菌体細胞を効率的に破碎し、P H A を回収後酵素及び／又は界面活性化剤で処理する。さらに、P H A を親水性溶媒に懸濁し、該懸濁液の沸点以下の温度で攪拌することにより凝集させ P H A の粒度を大きくする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2003-011099

受付番号

50300079960

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成15年 1月21日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年 1月20日

次頁無

願 2003-011099

ページ: 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所  
氏 名

1990年 8月27日

新規登録

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**